



ESTELA DE OLIVEIRA LIMA

INOVAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE:

Potencial método não invasivo associado à espectrometria
de massas de alta resolução

INNOVATION IN LEPROSY DIAGNOSIS:

*Potential non-invasive method associated to high resolution
mass spectrometry*

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ESTELA DE OLIVEIRA LIMA

INOVAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE:
Potencial método não invasivo associado à espectrometria de massas de alta
resolução

*INOVATION IN LEPROSY DIAGNOSIS:
Potential non-invasive method associated to high resolution mass spectrometry*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

*Doctorate thesis presented to the School of Medical Sciences of the
University of Campinas as part of the requirements to obtain the
Ph.D. degree in Sciences.*

ORIENTADOR: RODRIGO RAMOS CATHARINO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DE DOUTORADO
DEFENDIDA PELA ALUNA ESTELA DE OLIVEIRA LIMA, E ORIENTADA PELO PROF.
DR. RODRIGO RAMOS CATHARINO.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

L628i Lima, Estela de Oliveira, 1981-
Inovação no diagnóstico da hanseníase : potencial
método não invasivo associado à espectrometria de
massas de alta resolução / Estela de Oliveira Lima. --
Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador : Rodrigo Ramos Catharino.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hanseníase. 2. Diagnóstico. 3. Espectrometria de
massas por ionização por electrospray. 4. Dióxido de
silício. I. Catharino, Rodrigo Ramos, 1977-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Innovation in leprosy diagnosis : potential non-invasive method
associated to high resolution mass spectrometry

Palavras-chave em inglês:

Leprosy

Diagnosis

Spectrometry, Mass, Electrospray ionization

Silicon dioxide

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Rodrigo Ramos Catharino [Orientador]

Maruska do Rocío Neufert Fernandes

Luciana Maria de Hollanda

Valdo José Dias da Silva

Andréa Balan Fernandes

Data de defesa: 05-03-2015

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ESTELA DE OLIVEIRA LIMA

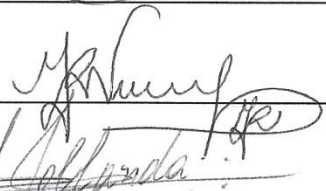
Orientador (a) PROF(A). DR(A). RODRIGO RAMOS CATHARINO

MEMBROS:

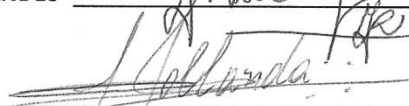
1. PROF(A). DR(A). RODRIGO RAMOS CATHARINO



2. PROF(A). DR(A). MARUSKA DO ROCÍO NEUFERT FERNANDES



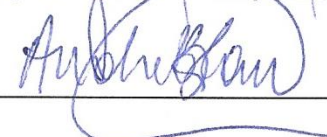
3. PROF(A). DR(A). LUCIANA MARIA DE HOLLANDA



4. PROF(A).DR(A). VALDO JOSÉ DIAS DA SILVA



5. PROF(A).DR(A). ANDRÉA BALAN FERNANDES



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 05 de março de 2015

RESUMO

A Hanseníase é uma doença infecciosa e crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. Este patógeno infecta principalmente macrófagos e células de Schwann e apresenta alta distribuição pela pele e nervos periféricos. Clinicamente, a forma mais comum de identificação da doença é a presença de espessamento de nervos e lesões hipocrômicas com perda de sensibilidade, entretanto, 30% dos pacientes infectados podem não apresentar manifestação clínica típica. Atualmente, o teste considerado padrão ouro no diagnóstico da Hanseníase é a baciloscopia, diretamente dependente de biópsia de pele, um método invasivo e com baixa sensibilidade para as formas mais brandas da doença. O desenvolvimento de um método rápido, sensível e não invasivo seria de grande importância para o diagnóstico assertivo da hanseníase. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar marcadores lipídicos em pacientes com Hanseníase diretamente a partir de “imprint” de pele, usando a espectrometria de massas como estratégia analítica. Para a coleta do “imprint” de pele, uma placa de sílica foi levemente pressionada contra a pele dos pacientes ou dos indivíduos saudáveis (grupo controle). Os lipídeos adsorvidos pela placa de sílica foram extraídos e submetidos à ionização por *eletroctrospray* e infusão direta em espectrômetro de massas de alta resolução (ESI-HRMS). Todas as amostras foram diferenciadas por análise estatística multivariada baseada na plataforma de lipidômica, o que ajudou a eleger marcadores de diferentes classes de lipídeos. As análises identificaram leucotrieno E4, glicosilceramida, fosfatidilserina, phthiocerol e ácido α -smegmamicólico como marcadores do grupo com hanseníase, diferentemente do grupo de indivíduos saudáveis, cujos marcadores identificados pertencem às classes de fosfolipídeos e gangliosídeos, próprios da constituição natural da pele. Os resultados encontrados indicam que o “imprint” de pele em placa de sílica, associado à ESI-HRMS, é promissor como método rápido e sensível para o diagnóstico da Hanseníase. Assim sendo, o método desenvolvido apresenta grande potencial para auxiliar na redução da cadeia de transmissão da Hanseníase, uma vez que quanto mais precoce for o diagnóstico, mais cedo se inicia o tratamento.

Palavras-chave: Lepra, Detecção, ESI-HRMS, Placa de sílica.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, which primarily infects macrophages and Schwann cells, presenting higher distribution on skin and peripheral nerves. Clinically, the most common form of identification is through the observation of anesthetic lesions; however, up to 30% of infected patients may not present this clinical manifestation. Currently, the gold standard diagnostic test for leprosy is based on skin lesion biopsy, which is invasive and presents low sensibility for suspect cases. Therefore, the development of a fast, sensible and noninvasive method that identifies infected patients would prove helpful for assertive diagnosis. The aim of this work was to identify lipid markers in leprosy patients directly from skin imprints, using a mass spectrometric analytical strategy. For skin imprint samples, a 1 cm² silica plate was gently pressed against patients' or healthy volunteers' skin. Imprinted silica lipids were extracted and submitted to direct-infusion electrospray ionization high-resolution mass spectrometry (ESI-HRMS). All samples were differentiated using a lipidomics-based data workup employing multivariate data analysis, which helped electing markers from distinct lipid classes. Results indicated that phospholipids, sphingolipids and mycolic acids, which were absent in healthy control subjects, clearly presented different intensities when compared to patients' samples. Results indicate that silica plate skin imprinting associated with ESI-HRMS is a promising fast and sensible leprosy diagnostic method, even for patients without clinical skin manifestations. With an early leprosy diagnosis, an early and effective treatment can be feasible and thus the chain of leprosy transmission can be abbreviated.

Keywords: Hansen's disease; Detection; ESI-HRMS; Silica plate.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	ix
AGRADECIMENTOS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	13
OBJETIVOS	17
CAPÍTULO 1 – <i>IMPRINT</i> DE PELE EM PLACA DE SÍLICA: UM POTENCIAL MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA HANSENÍASE ASSOCIADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO.....	18
Abstract	19
Introdução.....	20
Pacientes e Métodos	21
Resultados	22
Discussão e Conclusão	26
Referências	29
Supporting Information.....	32
CONCLUSÕES GERAIS	33

DEDICATÓRIA

À minha família, mas principalmente a meus pais, por
sempre me incentivarem a crescer e buscar meus sonhos.

Em especial ao meu marido, Carlos Renato Jr.,
que foi meu porto seguro e meu apoio em
todos os momentos, até mesmo quando
foi preciso abdicar para recomeçar!

AGRADECIMENTOS

Agradeço sobretudo a Deus por tantas oportunidades de aprendizado e crescimento nestes últimos quatro anos!

Agradeço muito ao professor Rodrigo Ramos Catharino, que me abriu as portas quando tudo parecia perdido, e que me ensinou que persistência, perseverança, fé e acima de tudo, Ética podem nos levar a alcançar nossos sonhos! Me ensinou também que otimismo, alegria e paixão pelo que se faz, torna a vida mais leve e nos leva a percorrer caminhos nunca antes imaginados.

Agradeço ao meu moço, Júnior, que sempre me incentiva, me acalma, me ajuda a enxergar adiante e traz alegria para todos os meus dias! O que seria de mim sem você? Te amo!

Agradeço aos meus pais, Reinaldo e Dalva, e a meus irmãos, Vívian e Thiago, que apesar da distância sempre estiveram ao meu lado, sorrindo e dizendo: “falta só mais um pouquinho!”... e não é que era verdade!?

Agradeço também à minha terapeuta Isabel, que me ajudou a abrir os olhos e compreender a vida de maneira mais clara, que me ensinou que a vida e o trabalho devem ser conduzidos com amor e dedicação, e que a perfeição é ilusão, embora devamos fazer tudo com o melhor de nós!

Em especial à minha amiga Maruska, grande incentivadora de toda a mudança que aconteceu nesses últimos meses! Te admiro muito pela coragem, força e fé inabaláveis!

À minha amiga Mônica, que se mostrou uma pessoa sensível e de coração gigante, confiando em mim e me abrindo caminhos quando eu mais precisava!

Agradeço à minha amiga Cibelee!!!! Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos, pela paciência e por tudo o que tem me ajudado nesses últimos meses! Esse trabalho também é fruto do seu esforço e dedicação, Cibelaaaaa!!!!

Agradeço à família Camp-mineira que formamos em Campinas! Em especial aos amigos Ana Helena, Alisson, Ana Paula, Silvio, Danieli, Isabelle, Ricardo, Maruska, Carlos Passos Jr., Michelle e João. Vocês significam muito para mim! Amigos especiais que estiveram presentes em quase todos os momentos dessa jornada! A vocês o meu MUITO OBRIGADA!!!!

Agradeço a todos os novos amigos, Cibelee, Tatiane, Diogo, Gustavo, Luís, Ana, Maico e Frenando, por toda a ajuda e incentivo que me deram nesses últimos meses! Sem vocês, nada disso se tornaria real! Obrigada também por me mostrarem que a alegria é parte fundamental do trabalho e que sem ela, nada faz sentido!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Formas de classificação da Hanseníase de acordo com o índice bacteriano (IB) e com o grau da resposta imune em cada forma da doença.....4
- Figura 2 Representative fingerprinting of Control (A) and Leprosy (B) groups. The imaging represents a sum of all ions within mass range m/z 600-1500 on positive ion mode. (C) Principal component analysis of skin samples. Ion chemical markers of each group separated by principal component analysis. ■ Control group (CT); ♦ Leprosy injured skin group (LL)..... 23
- Figura 3 Representative fingerprinting of Control (A) and Leprosy (B) groups. The imaging represents a sum of all ions within mass range m/z 600-1500 on positive ion mode. (C) Principal component analysis of skin samples. Ion chemical markers of each group separated by principal component analysis. ■, Control group (CT); ●, Leprosy uninjured skin group (LS)... 24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lipid chemical markers identified via HR-FTMS of skin imprints (positive ion mode). Identification is based on the comparison between the exact and theoretical masses of each compound and Lipid Maps, METLIN and Human Metabolome databases.....	25
Tabela S-1	Table S-1. Clinical and laboratorial data from leprosy patients and control subjects.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB	<i>Acid fast bacilli</i>
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
BB	Forma <i>borderline-borderline</i>
BL	Forma <i>borderline-lepromatosa</i>
BT	Forma <i>borderline-tuberculóide</i>
CoA	<i>Coenzyme A</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CT	<i>Control</i>
DDS	Diamino-difenil-sulfona
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Espectrômetro de massas
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
GC	<i>Gas chromatography</i>
GlcCer	<i>Glucosylceramide</i>
HMDB	<i>Human metabolome database</i>
HR-FTMS	<i>High-resolution Fourier transform mass spectrometry</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
IB	Índice bacteriano
IL	Interleucina

LB	<i>Lamellar body</i>
LL	Forma lepromatosa
LS	<i>Leprosy uninjured skin</i>
LT	<i>Leukotriene</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MB	Multibacilar
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Paucibacilar
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGL-1	<i>Phenolic glycolipid 1</i>
ppm	<i>Parts-per million</i>
PQT	Poliquimioterapia
SC	<i>Stratum corneum</i>
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TT	Forma tuberculóide

INTRODUÇÃO GERAL

1.0 Hanseníase

1.1 Histórico

A Hanseníase, também conhecida como Lepra até meados do século passado, é uma doença crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, patógeno identificado em 1873 pelo pesquisador Gerhard Henrik Armauer Hansen (Eidt, 2004). Trata-se de uma das doenças incapacitantes mais relatadas na história cujos registros datam de cerca de 3000 anos atrás (Hussain, 2007). Até pouco tempo atrás o agente causador da doença era desconhecido e não havia tratamento para a lepra. Além disso, é uma doença altamente contagiosa cujos pacientes, quando não tratados, desenvolvem lesões cutâneas graves capazes de levar a mutilações e tornar o indivíduo incapacitado para as mais simples tarefas. Todos esses fatores contribuíram para o surgimento de um estigma social em torno dos indivíduos infectados com o *Mycobacterium leprae*, sendo que desde os primeiros relatos históricos da doença, os pacientes eram levados a leprosários e excluídos do convívio social (Charoon, 1995). O estigma social em torno da lepra afeta o indivíduo física e psicologicamente e compromete as relações interpessoais em geral, como casamento, emprego e até mesmo atividades de lazer (Rafferty, 2005). Com base em todos esses problemas, Stanley Stein, um paciente e ativista em prol do fim da estigmatização social associada à palavra lepra, deu início ao processo de mudança do nome “Lepra” para doença de Hansen, ou Hanseníase, que atualmente é adotado em todo o mundo (revisado por John, 2012).

1.2 Epidemiologia

A prevalência da hanseníase vem reduzindo substancialmente nos últimos 50 anos, principalmente após o surgimento do primeiro medicamento (diamino-difenil-

sulfona_DDS) em meados do século XX (Faget, Johansen& Ross, 1942) e com a poliquimioterapia (PQT), recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a partir da década de 80. Três décadas atrás, mais de 122 países apresentavam altos índices de prevalência da doença, mas em 2012 a OMS constatou que menos de 20 países ainda apresentam incidência maior que 1000 casos novos por ano, indicativo de que a hanseníase está gradualmente se tornando limitada (WHO, 2013). Dentre esses países, o Brasil é um dos que ainda não conseguiu atingir a meta da OMS estipulada em 1991, em que a taxa de prevalência da doença deve ser menor do que 1 caso para cada 10.000 habitantes (WHO, 1991). Atualmente, a taxa de prevalência no Brasil é de 1,51 para cada 10.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2014), indicativo de que a doença permanece como problema de saúde pública no país. Em Agosto de 2011, o governo brasileiro assumiu o compromisso público de eliminar a carga da Hanseníase bem como eliminar seus agravos a partir da formulação do Plano Integrado de Ações Estratégicas 2011-2015 (Decreto nº 7.530, de 21 de julho de 2011). Para atingir a meta estipulada pela OMS, o plano do ministério da saúde definiu um conjunto de ações estratégicas baseadas essencialmente no aumento da detecção precoce e na cura dos casos diagnosticados. Apesar da grande dificuldade de diagnóstico precoce para a hanseníase, diferentes parcerias e campanhas vêm sendo estabelecidas com o objetivo de conscientizar, identificar, diagnosticar e tratar os indivíduos doentes, reduzindo a morbidade e permitindo que a hanseníase deixe de ser um problema de saúde pública no país.

1.3 Patogênese

A forma de transmissão da hanseníase ainda não está muito clara, mas acredita-se que ocorra por contato próximo e prolongado entre um indivíduo susceptível e um paciente infectado através da inalação de secreções nasais ou por contato com lesões cutâneas (Shepard, 1962; Job, 1990; Ghorpade, 2002; Jobet al.,

2008). O tempo de geração do *Mycobacterium leprae* é de aproximadamente duas semanas, o que contribui para um longo período de incubação do patógeno, de 6 meses a 20 anos (Lastória& Morgado de Abreu, 2014).

O *Mycobacterium leprae* induz um amplo espectro de manifestações clínicas da doença, e os fatores do hospedeiro que regulam a susceptibilidade a essas diferentes manifestações são ainda pouco conhecidos. Estudos de polimorfismos sugerem que os fatores genéticos influenciam a susceptibilidade individual à hanseníase e às variadas formas da doença. Variações nos genes de receptores do tipo Toll (TLRs) e de citocinas vêm sendo amplamente estudadas, dentre elas, polimorfismos nos genes TLR1 e IL-10 podem definir o tipo de resposta imune que será ativada e explicar as várias formas de manifestação da doença (Johnson et al., 2007; Misch et al., 2008; Pereira et al., 2008).

Após o estabelecimento da infecção, o *Mycobacterium leprae* pode levar ao desenvolvimento de duas formas principais da doença, a Tuberculóide (TT) ou a Lepromatosa (LL) (Ridley & Jopling, 1966). A primeira é observada em pacientes que desenvolvem resposta imune mediada por células (resposta do tipo Th1) e é caracterizada por formação de granulomas (baixa quantidade de bacilos) e morte de células de Schwann, levando à degradação da bainha de mielina e à destruição nervosa (Schollard et al., 1982; Vissa&Brennan, 2002). Os pacientes da forma TT apresentam lesões únicas ou em pequena quantidade, caracterizadas por placas eritematosas assimétricas, com bordas externas elevadas e centro hipocrômico, já apresentando redução de sensibilidade (Lastória& Morgado de Abreu, 2014).

Pacientes cuja resposta Th1 é insatisfatória, apresentam um predomínio da resposta imune humoral (tipo Th2) e desenvolvem a forma Lepromatosa da doença, em que há lesões disseminadas e elevada quantidade de bacilos nas células do hospedeiro, especialmente macrófagos e células de Schwann (Schollard et al., 2000; Vissa&Brennan, 2002; Cosma et al., 2003; Mattos et al., 2011). À medida que a doença progride, as

lesões se espalham formando placas e nódulos (lepromas) e podem acometer pele, olhos, nervos e linfonodos. São bem caracterizadas pelo acúmulo de macrófagos espumosos, células fagocíticas preenchidas com gotículas lipídicas e que contêm numerosos bacilos que se utilizam desse acúmulo lipídico para sobrevivência e replicação. Os macrófagos espumosos se expandem lentamente pelo organismo do indivíduo, principalmente pelas extremidades e desfiguram o corpo do indivíduo (Stehret al., 2013). Na forma LL, as lesões se localizam preferencialmente em áreas mais frias do corpo e tendem a ser múltiplas, simétricas, hipocrômicas, eritematosas ou acastanhadas com bordas indefinidas (Lastória& Morgado de Abreu, 2014).

1.4 Classificação

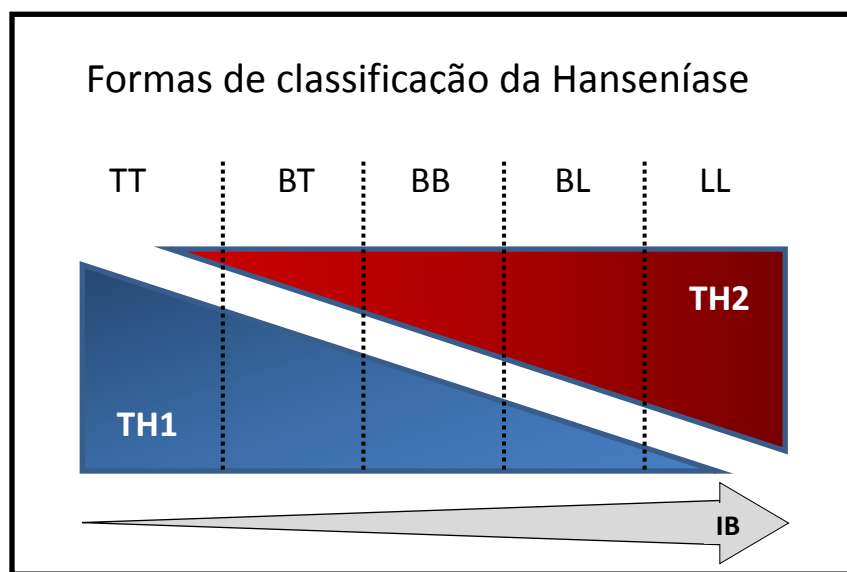


Figura 1. Formas de classificação da Hanseníase de acordo com o índice bacteriano (IB) e com o grau da resposta imune em cada forma da doença.

As formas TT e LL representam dois extremos da doença, mas a maioria dos pacientes se encaixa em uma ampla categoria entre essas duas formas polarizadas, conhecida como *borderline*. As formas *borderline* da hanseníase se subdividem em:

borderline tuberculóide (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderlinelepromatosa* (BL), que são definidas de acordo com o tipo de resposta imune prevalente (Fig. 1). Os pacientes *borderline* apresentam manifestações clínicas diferentes devido à variabilidade da resposta imune celular ao *M. leprae*. As lesões do subgrupo BT se assemelham às lesões da forma TT quanto à aparência e perda de sensibilidade, mas são menores e numerosas. O espessamento de nervos tende a ser irregular, menos intenso, mas mais numeroso. No caso do subgrupo BB, as lesões cutâneas exibem características das formas TT e LL, com distribuição assimétrica e moderado acometimento nervoso. Entretanto, a presença de placas eritematosas com enfraquecimento das bordas externas e centro oval hipopigmentado é sugestivo de lesões do subgrupo BB. Já as lesões do grupo BL se parecem com o subgrupo LL, com tendência a se apresentarem em grandes quantidades, mas não tão simétricas e com perda de sensibilidade em alguns pontos (Ridley & Jopling, 1966).

A inespecificidade das manifestações clínicas das formas *borderline* da doença dificulta o diagnóstico correto. Com base nisso, a OMS estabeleceu um método de classificação simplificada em que os pacientes foram divididos em Paucibacilar (PB) – até 5 lesões cutâneas e/ou apenas um tronco nervoso afetado; e Multibacilar (MB) – mais de 5 lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso afetado. A partir de então, os pacientes PB abrangem as formas TT e TB, e os pacientes MB compreendem as formas BB, BL e LL (WHO, 1998; Jacobson & Krahenbuhl, 1999).

Embora essa classificação seja útil para o diagnóstico de grande parte das manifestações clínicas da hanseníase, existem casos em que o paciente apresenta lesões cutâneas ou sintomas sugestivos de dano nervoso, mas não apresentam sinais específicos da hanseníase. Nesses casos, o indivíduo é considerado um “caso suspeito” pela OMS, e essa incerteza retarda o diagnóstico e o tratamento, o que favorece o

contágio de outros indivíduos e até mesmo o desenvolvimento de lesões incapacitantes (WHO, 2014).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é feito principalmente com base em avaliação clínica, mas o diagnóstico laboratorial também é utilizado para auxiliar no diagnóstico diferencial.

Clinicamente, o diagnóstico é feito de acordo com as características das lesões de pele que, em geral, apresentam diminuição ou ausência de sensibilidade e alterações na cor da pele. De acordo com o grau da doença, as lesões podem se apresentar na forma de manchas esbranquiçadas ou avermelhadas, pápulas, infiltrações, tubérculos ou nódulos. Na fase inicial da doença, observa-se também edema de mãos e pés, febre, artralgia, mal estar geral, feridas e ressecamento do nariz. As lesões em nervos periféricos também podem estar presentes e se manifestam sob a forma de dor e/ou espessamento dos nervos afetados, com diminuição ou perda de sensibilidade, bem como a redução ou perda de força nos músculos inervados pelos nervos afetados (BRASIL, 2010). Devido à variabilidade de manifestações clínicas da infecção, há doenças que apresentam lesões com características semelhantes às da hanseníase, tornando o diagnóstico clínico mais difícil e menos assertivo.

Para auxiliar no diagnóstico mais preciso da hanseníase, o teste considerado padrão ouro para o diagnóstico laboratorial dessa infecção baseia-se em baciloscopia de esfregaço intradérmico e/ou coleta de biópsia a partir de uma lesão cutânea ativa (Scollard et al., 2006). A baciloscopia tem como objetivo a visualização do bacilo a partir da coloração da amostra pelos métodos de Ziehl-Nielsen. Já a biópsia é submetida à análise histopatológica para observação de nervos cutâneos afetados e identificação de bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) pela coloração de Wade ou Fite-Faraco modificado. Nos casos de lesões paucibacilares, onde o bacilo é raro e de difícil visualização, o diagnóstico diferencial da resposta se torna mais difícil, pois as lesões se

assemelham a outros tipos de doenças de pele, como por exemplo, Píriases e Lúpus eritematoso (Lastória& Morgado de Abreu, 2014).

Existem outros testes em estudo para o diagnóstico da Hanseníase, mas não estão disponíveis para o diagnóstico de rotina, como ELISA e PCR. Apesar de apresentarem potencial para diagnóstico, há controvérsias quanto à eficiência de detecção quando comparados às técnicas convencionais (Martinez et al., 2006; Rudeeaneksin et al., 2008). Além disso, são técnicas de alto custo e que demandam uma equipe de profissionais altamente qualificados para a execução dos procedimentos.

1.6 Tratamento

O tratamento da Hanseníase teve início a partir do desenvolvimento da sulfona por Faget e colaboradores, em 1942. Entretanto, o surgimento de casos resistentes a esse tratamento levou à recomendação da poliquimioterapia pela OMS em 1982, que foi adotado oficialmente pelo Brasil em 1993.

Atualmente, o tratamento da hanseníase no Brasil segue a portaria Nº 3125 do Ministério da Saúde, que estabelece o tratamento de acordo com a classificação PB e MB. Para os pacientes que apresentam a forma PB da doença, a PQT é composta por Rifampicina e Dapsona. Já o tratamento da forma MB é feito por PQT com Rifampicina, Dapsona e Clofazimina. Para os dois tipos de PQT, a dose é dependente da faixa etária do paciente, e o esquema terapêutico compreende doses diárias autoadministradas e doses mensais supervisionadas. O tempo de tratamento é longo, sendo que para a forma paucibacilar, o paciente deve fazer o tratamento por pelo menos 9 meses, e para a forma multibacilar, por um período de até 18 meses. A PQT para o tratamento da hanseníase leva à destruição do bacilo de forma segura e efetiva, sendo que os pacientes tratados podem se considerar curados da doença (WHO, 2000; Brasil, 2010).

2.0 Lipidômica

A biologia de sistemas é uma disciplina que busca decifrar as relações entre diferentes partes de um sistema biológico com o objetivo de compreender o comportamento dos sistemas como um todo. A metabolômica é o estudo sistemático do grupo de moléculas não-protéicas, de baixo peso molecular, sintetizadas no interior da célula e que podem representar os efeitos *downstream* de expressão gênica e síntese protéica, uma vez que correlaciona a base molecular com o fenótipo vigente (Daviss, 2005; Gomaseet al., 2008). A Lipidômica, um ramo da metabolômica, é um estudo de todos os lipídeos, das moléculas com as quais eles interagem e de suas funções dentro de um sistema biológico. De todas as moléculas que compreendem a metabolômica, os lipídeos constituem o maior grupo, formado por milhares de espécies moleculares distintas existentes nas células e tecidos. Na última década, tornou-se cada vez mais evidente que os lipídeos não atuam apenas como estoques de energia, mas também são parte vital dos processos de regulação celular. Exibem uma ampla variedade de funções, como separação de compartimentos sub-celulares, manutenção de gradientes eletroquímicos, sinalização celular como primeiros e segundos mensageiros, estoque de energia, tráfego de proteínas e ancoramento em membrana (Carrasco-Pancorbo, Navas-Iglesias & Cuadros-Rodríguez, 2009). Como as propriedades biológicas dependem fortemente da estrutura química, cada molécula lipídica tem um papel individual em um sistema biológico. Qualquer desequilíbrio neste sistema pode levar a várias condições fisiopatológicas, como por exemplo, o diabetes, aterosclerose, esteatose hepática, inflamação crônica, doenças neurodegenerativas, dentre outras... (Eckel, Grundy & Zimmet, 2005; Bochkovet al., 2010).

Assim sendo, a análise dos lipídeos presentes nos sistemas biológicos é uma ferramenta poderosa que permite estabelecer uma correlação entre as moléculas e fenótipo vigente.

3.0 Lipidômica e Espectrometria de Massas

Historicamente, a lipidômica se serviu de técnicas analíticas de baixa resolução e sensibilidade, em que a análise das moléculas é restrita ao estudo de classes lipídicas (ex. cromatografia de camada delgada). O surgimento da cromatografia gasosa tornou possível a separação de diferentes ácidos graxos a partir de amostras simples (James & Martin, 1956). Entretanto, a identificação e quantificação de lipídeos individuais a partir de amostras complexas permaneciam desafiadoras. Esse campo de estudos avançou consideravelmente a partir do momento em que a cromatografia gasosa foi associada à espectrometria de massas (Ryhage&Stenhagen, 1960).

Ao longo das décadas, o avanço na área de espectrometria de massas tem sido notável, principalmente no aprimoramento de técnicas de ionização, uma vez que para este tipo de análise, é necessário que as moléculas da amostra estejam carregadas e na forma de íons positivos ou negativos. Novas técnicas de ionização branda vêm surgindo, tais como ionização/dessorção a laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization* – MALDI), ionização por spray de elétrons (*electrospray ionization* - ESI) e ionização química por pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* – APCI), que têm possibilitado a avaliação rápida e sensível da maioria, ou fração substancial, dos lipídeos em uma única análise (Harkewicz& Dennis, 2011; Hu et al., 2009; Griffiths et al., 2011).

Para a análise em espectrômetro de massas (EM), as amostras podem ser submetidas a diferentes processos de extração de lipídeos baseados em clorofórmio ou metanol, descritos por Folch (1957) e Bligh&Dyer (1959). Em um típico experimento de lipidômica, a amostra lipídica é injetada no EM, ionizada e vaporizada, resultando em íons que são separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z) no analisador de massas (Loizides-Mangold, 2013). ‘

Existem duas ferramentas fundamentais para identificação e quantificação de lipídeos por EM. O primeiro, e o mais tradicional, é o CLASS (“ComprehensiveLipidomicsAnalysisbySeparationSimplification”), baseado na separação de diferentes categorias de lipídeos utilizando extração e separação cromatográfica antes da análise de massas. A segunda ferramenta, também chamada de “ShotgunLipidomics”, omite a separação cromatográfica e analisa essencialmente todas as classes de lipídeos por injeção direta no espectrômetro de massas. Essa técnica emprega diferentes fontes de ionização como, por exemplo, ESI (*electrosprayionization*) e/ou soluções ionizantes para favorecer a análise de classes específicas de lipídeos. Tanto CLASS quanto ShotgunLipidomics geram um espectro de sinais, de acordo com a relação m/z e abundância relativa, que pode ser considerado como o perfil de lipídeos no extrato da amostra(Harkewicz& Dennis, 2011; Loizides-Mangold, 2013).

Uma nova geração de espectrômetros de massas, particularmente *Fourier transform-ioncyclotronresonance*(FT-ICR) e *Fourier transformOrbitrap*(FT-Orbitrap), vêm surgindo como poderosas ferramentas em Lipidômica, pois apresentam escaneamento rápido da amostra e alta acurácia para identificação de massa (1-3 ppm) (Griffiths& Wang, 2009;Shevchenko &Simons, 2010). Nos instrumentos baseados em FTMS, os íons são aprisionados em um forte campo magnético. No momento em que os íons estão excitados na “armadilha”, o sinal é detectado, digitalizado e convertido em domínio de frequência e espectro de massas, usando a transformada de Fourier. A estabilidade e uniformidade de campo inerente aos magnetos supercondutores, em sinergia com a elevada acurácia e faixa dinâmica de medida de frequência tornam essa técnica campeã em poder de resolução e acurácia de massas (Marshall &Verdum, 1990; Zubarev&Makarov, 2013).

O rápido desenvolvimento das técnicas analíticas em Lipidômica tem permitido que grande quantidade de dados seja gerado em um período de tempo relativamente curto, sendo que é necessário a utilização de ferramentas de bioinformática apropriadas

para a identificação e quantificação das moléculas de acordo com os dados de m/z gerados nos espectros. Diferentes bancos de dados e softwares vêm sendo desenvolvidos, como por exemplo, o consórcio LIPID MAPS (Fahy et al., 2007), que tenta estabelecer um sistema padrão para a nomenclatura dos lipídeos e permite a integração de bancos de dados com grupos de dados novos de forma mais simplificada (Blanksby& Mitchell, 2010).

Todo esse aprimoramento possibilita a aplicação da espectrometria de massas, com grande confiabilidade e sensibilidade, em diversos campos científicos e tecnológicos da atualidade, como estudos de compostos nas áreas da química analítica e ambiental, da bioquímica, da biologia e da medicina (Kaddurahet al., 2008).

4.0 Lipidômica e Diagnóstico

O conjunto de lipídeos em um sistema biológico é crítico para a manutenção da saúde, uma vez que apresentam importantes papéis na homeostase celular, como constituição estrutural de membranas, sinalização celular, interações moleculares e modulação de tradução e transcrição (Watson, 2006). Portanto, qualquer alteração na constituição lipídica de determinado sistema biológico pode ser indicativo de doença, como já observado em doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Loizides-Mangold, 2013).

A partir da identificação e caracterização estrutural dos lipídeos na lipidômica, é possível fazer sua integração às demais “ômicas”, ou seja, genômica, proteômica e metabolômica, e aprimorar a compreensão da função dos lipídeos em um sistema biológico, tanto em situações normais quanto em situações de doença. Portanto, a análise lipidômica associada à espectrometria de massas pode permitir a identificação de marcadores lipídicos que diferenciem amostras saudáveis de amostras doentes, o que

pode no futuro vir a ser utilizado como ferramenta diagnóstica (Layre&Moody, 2013; Loizides-Mangold, 2013).

Referências da Introdução

Blanksby, S. J. & Mitchell, T. W. 2010. Advances in Mass Spectrometry for Lipidomics. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 3:433–65.

Bligh, E. G. & Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem.* 37: 911-917.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2010. Guia de procedimentos técnicos – Baciloscopia em Hanseníase. Ed. MS. Brasília-DF.

BRASIL. Ministério da Saúde. Campanha Nacional de Hanseníase - Informe Técnico.

[acesso 12 dez 2014]. Disponível em: http://www.suvisa.ba.gov.br/sites/default/files/vigilancia_epidemiologica/doencas_transmissoes/arquivo/2014/06/09/Informe%20Campanha%20Escolares%202014%2022%20abril%20rev%20CGHDE.pdf

BRASIL. Ministério da saúde. Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da hanseníase. PORTARIA Nº 3.125, de 7 de outubro de 2010.

Carrasco-Pancorbo, A.; Navas-Iglesias, N.; Cuadros-Rodríguez, L. 2009. From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part 1: Modern lipid analysis. *Trends Anal. Chem.* 28: 263-278.

Charoon, P. 1995. Leprosy profile. Leprosy Division, Bangkok.

Cosma, C. L.; Sherman, D. R.; Ramakrishnan, L. 2003. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 641-676.

Daviss, B. 2005. Growing pains for metabolomics. *Scientist.* 19(8):25–28.

Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; Zimmet, P. Z. 2005. The metabolic syndrome. *Lancet.* 365(9468):1415-28; Bochkov, V.N.; Oskolkova, O.V.; Birukov, K.G. et al. 2010. Generation and Biological Activities of Oxidized Phospholipids. *Antioxid.Redox Signal.* 12: 1009–1059.

Eidt, L. M. 2004. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde Soc.* 13:76-88.

Faget, G. H.; Johansen, F. A.; Ross, H. 1942. Sulfanilamide in the treatment of leprosy. *Public Health Reports, Rockville,* v.57, p.1892-1899.

Fahy E, Sud M, Cotter D and Subramaniam S. (2007) LIPID MAPS Online Tools. LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucl.Acids Res.* 35, W606-612.

Folch, J.; Lees, M.; Stanley, S. G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.

- Ghorpade, A. 2002. Inoculation (tattoo) leprosy: a report of 31 cases. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 16:494-9.
- Gomase, V. S.; Changbhale, S. S.; Patil, S. A. et al. 2008. Metabolomics. Curr. Drug. Metab. 9: 89-98.
- Griffiths, W. J.; Ogundare, M.; Williams, C. M. et al. 2011. On the future of “omics”: Lipidomics. J. Inherit. Metab. Dis. 34: 583-592.
- Griffiths, W.J. & Wang, Y. 2009. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. Chem. Soc. Rev. 38: 1882–1896.
- Harkewicz, R. & Dennis, E. A. 2011. Applications of Mass Spectrometry to Lipids and Membranes. Annu. Rev. Biochem. 80: 301-325.
- Hu, C.; van der Heijden R.; Wang, M. et al. 2009. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 877: 2836-2846.
- Hussain, T. 2007. Leprosy and tuberculosis: an insight-review. Crit Rev Microbiol. 33: 15–66.
- Jacobson, R. R. & J. L. Krahenbuhl. 1999. Leprosy. Lancet. 353:655–660.
- James, A. T. & Martin, A. J. 1956. Gas–liquid chromatography: the separation and identification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to n-octadecanoic acid. Biochem. J. 63: 144-152.
- Job, C. K. 1990. Nasal mucosa and abraded skin are the two routes of entry of *Mycobacterium leprae*. Star. 49:1.
- Job, C. K.; Jayakumar, J.; Kearney, M. et al. 2008. Transmission of Leprosy: A Study of Skin and Nasal Secretions of Household Contacts of Leprosy Patients Using PCR. Am J Trop Med Hyg, 78(3): 518–521.
- John HV. Translating Leprosy: The Expert and the Public in Stanley Stein’s Anti-stigmatization Campaigns, 1931–60. J. Hist. Med. Allied. Sci. 68(4): 2012.
- Johnson, C. M.; Lyle, E. A.; Omueti, K. O. et al. 2007. A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. J. Immunol. 178:7520–7524.
- Kaddurah-Daouk, R.; Kristal, B.S.; Weinshilboum, R.M. 2008. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 48: 653-683.
- Kennedy, E. P. 1957. Metabolism of lipides. Annu. Ver. Biochem. 26: 119-148.

Lastória, J. C. & Morgado de Abreu, M. A. M. 2014. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects – Part 1. *An. Bras.Dermatol.* 89(2):205-218.

Layre, E. & Moody, D. B. 2013. Lipidomic profiling of model organisms and the world's major pathogens. *Biochimie.* 95: 109-115.

Loizides-Mangold, U. 2013. On the future of mass-spectrometry-based lipidomics. *FEBS Journal.* 280: 2817-2819.

Marshall, A. G. & Verdun, F. R. 1990. *Fourier Transforms in NMR, Optical, and Mass Spectrometry: A User's Handbook*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands.

Martinez, A. N.; Britto, C. F.; Nery, J. A. et al. 2006. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J. Clin. Microbiol.* 44:3154-9.

Mattos, K. A.; Lara, F. A.; Oliveira, V. G. et al. 2011. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell.Microbiol.* 13: 259-273.

Misch, E. A.; Macdonald, M.; Ranjit, C. et al. 2008. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2:e231.

Pereira, A. C.; Brito-de-Souza, V. N.; Cardoso, C. C. et al. 2008. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for 819C/T in leprosy susceptibility. *Genes. Immun.* 10:174–180.

Rafferty, J. 2005. Curing the stigma of leprosy. *Lepr.Rev.* 76: 119-126.

Ridley, D. S. & Jopling, W. H. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A fivegroup system. *Int. J. Lepr.* 34: 255-273.

Rudeeaneksin, J.; Srisungngam, S.; Sawanpanyalert, P. et al. 2008. LightCycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 54: 263-70.

Ryhage, R. & Stenhagen, E. 1960. Mass spectrometry in lipid research. *J. Lipid Res.* 1: 361-390.

Scollard, D. M. 2000. Endothelial cells and the pathogenesis of lepromatous neuritis: insights from the armadillo model. *Microbes Infect.* 2: 1835-1843.

Scollard, D. M.; Adams, L. B.; Gillis, T. P. et al. 1982. Chemotherapy of leprosy for control programmes. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 675:1-33.

Scollard, D. M.; Adams, L. B.; Gillis, T. P. et al. 2006. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(2): 338–381.

Shepard, C. C. 1962. The nasal excretion of *Mycobacterium leprae* in leprosy. *Int. J. Lepr.* 30:10-8.

Shevchenko, A. & Simons, K. 2010. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11: 593–598.

Stehr, M; Elamin A. A.; Singh, M. 2013. Lipid Inclusions in Mycobacterial Infections. *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management*. <http://dx.doi.org/10.5772/54526>.

Vissa, V. D. & Brennan, P. J. 2002. Impact of the *Mycobacterium leprae* genome sequence on leprosy research in: A. Danchin (Ed.), *Genomics of GC-rich Gram-positive bacteria*, Band 2, Caister Academic Press, pp. 85 – 118.

Watson, A. D. 2006. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J. Lipid Res.* 47: 2101-2111.

WHO Weekly epidemiological record. 2013. 88: 365–380.

WHO. 1998. Expert Committee on Leprosy, seventh report, vol. 874. WHO, Geneva, Switzerland.

WHO. Diagnosis of leprosy. In: *Leprosy elimination*. Acesso em 11/22/2014. <http://www.who.int/lep/diagnosis/en/>

WHO. Elimination of leprosy as a public health problem. 1991. Leprosy Resolution WHA 44.9, 44th World Health Assembly. Geneva; Available from: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/lep-wha-1991.htm>.

WHO. WHO recommended MDT regimens. 2000. Acesso em 15/12/2014. <http://www.who.int/lep/mdt/regimens/en/>.

Zubarev, R. A. & Makarov, A. 2013. Orbitrap Mass Spectrometry *Anal. Chem.* 85: 5288–5296.

Objetivos

Objetivo geral

Desenvolvimento de potencial método diagnóstico para a Hanseníase, utilizando como ferramenta analítica a Espectrometria de Massas de Alta Resolução.

Objetivos específicos

- Desenvolver um novo método para coleta de amostras de pacientes com Hanseníase, que seja sensível, rápido e não-invasivo;
- Identificar biomarcadores lipídicos presentes em *imprint* de pele de pacientes com Hanseníase e de indivíduos normais, utilizando espectrometria de massas de alta resolução (ESI-HRMS).

CAPÍTULO 1

***Imprint* de pele em placa de sílica: um potencial método diagnóstico para Hanseníase associado à Espectrometria de Massas de Alta Resolução.**

Skin imprinting in silica plates: a potential diagnostic methodology for leprosy using high-resolution mass spectrometry

Estela de Oliveira Lima^{a,‡}, Cristiana Santos de Macedo^{b,c,‡}, Cibele Zanardi Esteves^a, Diogo Noin de Oliveira^a, Maria Cristina Vidal Pessolani^c, José Augusto da Costa Nery^d, Euzenir Nunes Sarno^e, Rodrigo Ramos Catharino^{a,*}

^aINNOVARE Biomarkers Laboratory, School of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil, 13083-877

^bCenter for Technological Development in Health (CDTS), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21040-361

^cCellular Microbiology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21040-360

^dSouza Araújo Outpatient Clinic, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21040-360

^eLeprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21040-360.

ABSTRACT: Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, which primarily infects macrophages and Schwann cells, affecting skin and peripheral nerves. Clinically, the most common form of identification is through the observation of anesthetic lesions on skin; however, up to 30% of infected patients may not present this clinical manifestation. Currently, the gold standard diagnostic test for leprosy is based on skin lesion biopsy, which is invasive and presents low sensibility for suspect cases. Therefore, the development of a fast, sensible and noninvasive method that identifies infected patients would be helpful for assertive diagnosis. The aim of this work was to identify lipid markers in leprosy patients directly from skin imprints, using a mass spectrometric analytical strategy. For skin imprint samples, a 1 cm² silica plate was gently pressed against patients' or healthy volunteers' skin. Imprinted silica lipids were extracted and submitted to direct-infusion electrospray ionization high-resolution mass spectrometry (ESI-HRMS). All samples were differentiated using a lipidomics-based data workup employing multivariate data analysis, which helped electing different lipid markers, for example: mycobacterial mycolic acids, inflammatory and apoptotic molecules were identified as leprosy patients' markers. Otherwise, phospholipids and gangliosides were pointed as healthy volunteers' skin lipid markers, according to normal skin composition. Results indicate that silica plate skin imprinting associated with ESI-HRMS is a promising fast and sensible leprosy diagnostic method. With a prompt leprosy diagnosis, an early and effective treatment could be feasible and thus the chain of leprosy transmission could be abbreviated.

INTRODUCTION

Leprosy, also known as Hansen's disease, is a long-lasting infection caused by *Mycobacterium leprae* that affects primarily epidermal macrophages and peripheral nerves. Despite the fact that the disease prevalence has fallen substantially in the past 50 years¹, it still remains endemic in the tropics, especially in underdeveloped or developing countries, where it is considered an important public health concern^{2,3}. Being a chronic disease, leprosy results in long-term physical and social effects, stigmatizing patients due to the severe skin conditions and disabilities that worsen through time. Since ancient times, it has been seen as a terrifying disease and this concept still persists in most countries nowadays⁴⁻⁶.

Patients present a wide range of clinical and histopathological manifestations, which may occur in two main forms: tuberculoid (TT) or lepromatous leprosy (LL)⁷. The majority of patients, however, fall into a broad borderline category between these two polar forms; this is subdivided into borderline lepromatous (BL), mid-borderline (BB), and borderline tuberculoid (BT). These unspecific clinical manifestations significantly hamper the correct diagnosis⁸. For that reason, the World Health Organization (WHO), in 1988, established a simplified classification method, where leprosy patients were divided into paucibacillary (PB) - up to five lesions, and/or only one nerve trunk involved; and multibacillary (MB) – more than five skin lesions and/or more than one nerve trunk involved. Along with the clinical evaluation, PB patients comprise TT, BT leprosy forms, wherein MB patients comprise LL, LB and BB leprosy forms^{9,10}. A patient presenting skin lesions or symptoms suggestive of nerve damage, whose cardinal signs are absent or doubtful, should be called as suspect case in the absence of any immediately obvious alternate diagnosis¹¹. This uncertainty in diagnosis impedes the correct treatment and allows the development of disabling complications¹².

The clinical differential diagnosis of leprosy is extremely complex because of the variety of clinical manifestations and several skin diseases that present similar lesions. In order to enhance the accuracy in diagnosis, there are different laboratorial tests available; the routine laboratory diagnosis of leprosy is, however, essentially based on histopathological examination of skin biopsy sample and on skin smear microscopy (bacilloscopy). The first is based on Hematoxylin-eosin and Fite-Faraco tissue staining (or its variations) and evaluates histopathological characteristics according to the criteria established by Ridley and Jopling, as well as allows investigation of acid-fast bacilli (AFB) on skin sample^{7,13}. The bacilloscopy exam can be used for the semi quantitative enumeration of acid-fast bacilli (AFB) in infected skin and it is also useful in follow-up of patients during and after treatment^{8,9}. Although smear is positive in the multibacillary group (MB), bacilloscopy sensitivity is low in the suspect cases and paucibacillary group (PB), in which smear is often negative¹⁴. Despite the availability of these methods, laboratorial diagnosis is time-consuming, exhibits low sensitivity and depends on uncomfortable and invasive sampling. Because of uncertainties or delays in diagnosis, the multidrug therapy (MDT) recommended by WHO¹⁵ is delayed, mainly on suspect cases. This allows infected people to develop worse conditions and negatively influences in the eradication of leprosy as a public health problem. Presently, priority has been given in leprosy research to identify specific markers for *M. leprae* and develop sensitive and noninvasive material collection for laboratory tests, enabling accurate diagnosis, especially on suspect cases or those with very few symptoms¹³.

In this context, lipidomics has recently emerged as a crucial field of research providing an integrated view on the role of lipids involved in a wide range of cellular functions, including cellular and sub-cellular partitioning, maintenance of electrochemical gradients, cell signaling, energy storage, etc. Lipids are traditionally analyzed by gas

chromatography (GC); however, identification and quantification of lipid in complex samples remains difficult due to extensive extraction procedures and molecular lability. Furthermore, hydrolysis and derivatization reactions used in GC analyses make this technique more time consuming and may subject lipids to the formation of byproducts, thus interfering in the final results. To cope with these issues, mass spectrometry has been increasingly standing out as an important tool for lipid analysis; the development of soft ionization techniques, such as matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (ESI) made sensible and fast lipid evaluation in complex samples possible. For that reason, lipidomics research associated with mass spectrometry can be a powerful combination to elucidate phenotypic changes, especially in disease conditions¹⁶.

Previous studies on leprosy metabolomics showed an enhanced fatty acid metabolism on serum and skin from leprosy patients before MDT, specially of polyunsaturated fatty acids (omega-3 and omega-6), which are precursors of eicosanoids, substances involved in the regulation of inflammation and immunity^{17,18}. After MDT, eicosanoids proceeded to normal levels, pointing to the importance of these lipid mediators on leprosy pathophysiology. Recent study on lipidomics of skin from leprosy patients showed differences on phospholipid and sphingolipid signal intensities and distribution before and after MDT, evidencing the importance of lipids on leprosy pathogenesis¹⁹.

The aim of this study is to develop a new, noninvasive skin sample collection method, coupled with high resolution mass spectrometry analysis (HMRS) to help electing lipids that can be used as potential diagnosis biomarkers.

PATIENTS AND METHODS

Patients. Control subjects and leprosy patients were recruited at Souza Araújo Outpatient Clinic from Oswaldo Cruz Institute – Rio de Janeiro, and all human procedures were approved by CONEP – Research Ethical National Comitee / Brazil (nº 30621514.4.0000.5248). A total of 8 healthy control subjects and 8 leprosy patients prior to MDT, all male, aged 18-60 years, were evaluated (Table S-1, Supporting information). Control subjects presented neither skin disorders nor systemic diseases such as diabetes and kidney dysfunctions, which could have influenced epidermal function. Patients were clinically diagnosed as multibacillary, which was later confirmed by laboratory diagnosis (Table S-1, Supporting information).

Sample obtainment. For sample obtainment – skin imprints – a 1cm² silica plate (TLC Silica Gel 60 plate - Merck, Darmstadt, Germany) was gently pressed against the subjects' back for 1 minute. For leprosy patients, samples from two distinct regions were collected: leprosy lesion (L) and unaffected skin (S) imprints. Additionally, no cleaning procedures were performed on skin or lesion sites before sample collection, as that could affect the lipid composition of the sample.

High-resolution electrospray mass spectrometry (ESI-MS) analysis. Lipids were extracted from each skin-imprinted silica plate by extracting them with 1000 µL methanol directly in a plastic tube. Formic acid was then added to a concentration of 0.2% on each sample. For accurate identification of chemical markers, all samples were analyzed by high-resolution ESI-MS. For spectra acquisition, samples were directly infused in an ESI-LTQ-XL Orbitrap Discovery instrument (Thermo Scientific, Bremen, Germany) with nominal resolution of 30,000 (FWHM). All analyses were performed in the positive ion mode under the following conditions: sheath gas at 5 arbitrary units, flow rate of 10µL.min⁻¹

¹, spray voltage of 5 kV and capillary temperature of 280°C. Spectra were acquired over 60 seconds at the m/z range of 600–1500 for all samples.

Statistical analysis and chemical markers identification. Principal Component Analysis (PCA) was the software performed to cluster samples according to the relationship between m/z and intensity, with the results expressed as groups of samples with the same characteristics when considered these parameters. Mass range was established between m/z 600–1500 and a signal-to-noise threshold in a 3:1 ratio was established after extracting spectral data in tables of mass x intensity. No normalization was required, since all the samples were acquired within the same parameters. LIPID MAPS online database (University of California, San Diego, CA – www.lipidmaps.org) and HMDB version 3.6 (Human Metabolome database - www.hmdb.ca) were consulted to help guiding the choice for potential lipid markers. Structural propositions were performed using high resolution as the main parameter. Mass accuracy was calculated and expressed in terms of ppm shifts²⁰.

RESULTS

Metabolic fingerprinting: Leprosy lesion (L), unaffected skin from leprosy patient (S) and control skin (CT) groups were subjected to HR-FTMS analysis, as described in Section 2. The obtained metabolic fingerprints presented clear distinction when comparing L with CT (Figure 2), and S with CT (Figure 3). In order to evaluate these differences statistically, PCA was performed, confirming this observation.

Statistical analysis: the multivariate data analysis PCA was performed comparing the m/z and intensity of L and CT or S and CT precursor ion groups. As shown in Figures 2C and 3C, all groups were clearly discriminated with accuracy higher than 85%, and chemical markers of each group were selected for the structural elucidation.

Structural elucidation: experimental m/z ratios obtained by high-resolution ESI-MS were compared to their theoretical equivalent, taken from LIPID MAPS and HMDB. The maximum error was set at 2 ppm. Table 1 organizes this dataset as: the identified lipid species in each sample group and the mass error for each signal selected from the PCA. It is possible to note that CT markers (phosphatidic acids, gangliosides and *myo*-inositol-phosphate) were the same for the two PCAs performed, whereas the selected markers for S and L were interestingly the same (phthioceranic acid, glucosylceramide, phosphatidylserine, α -smegma mycolic acid), except for Leukotriene E4, which appears only as an L biomarker.

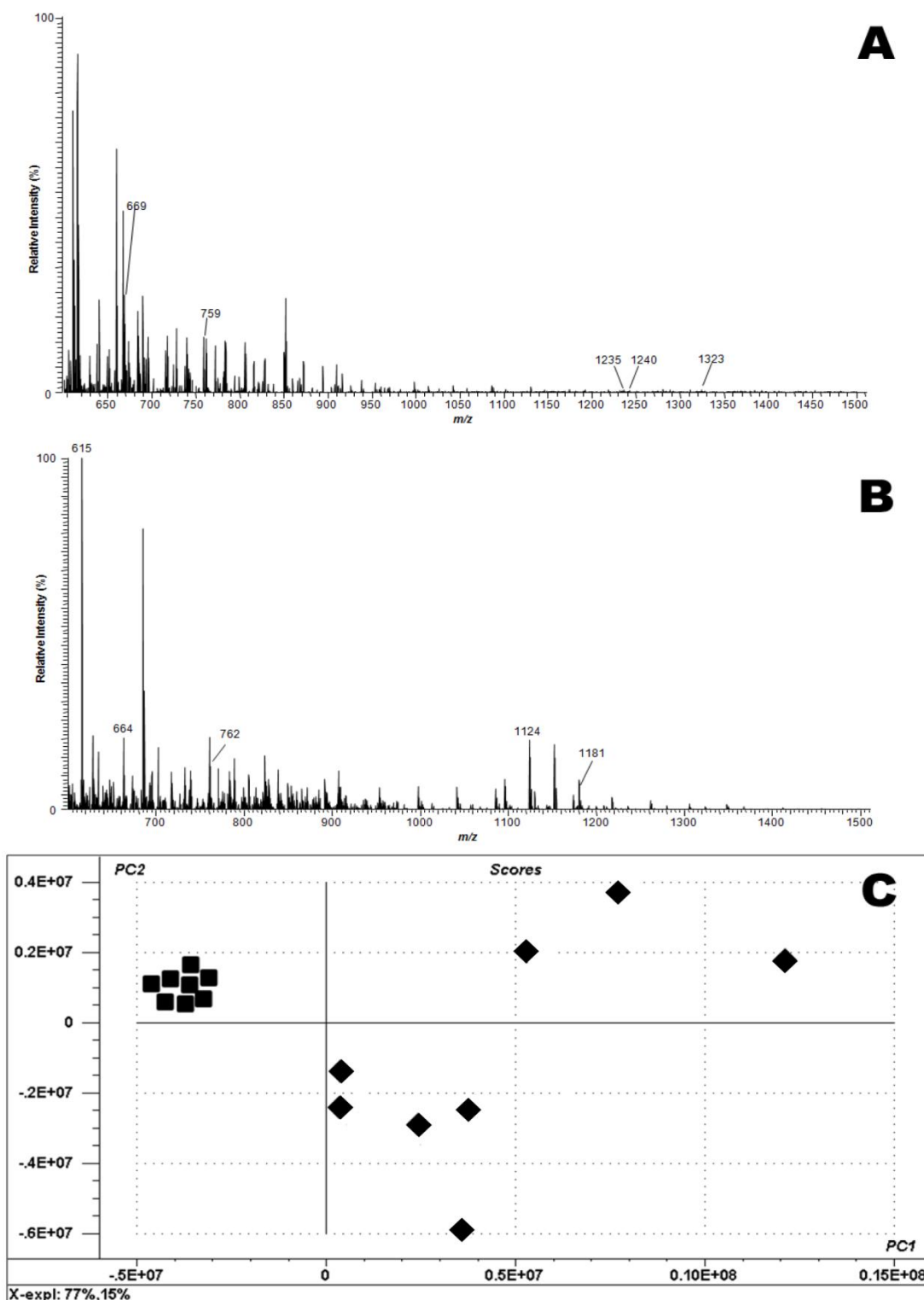


Figure 2. Representative fingerprinting of Control (A) and Leprosy (B) groups. The imaging represents a sum of all ions within mass range m/z 600-1500 on positive ion mode. (C) Principal component analysis of skin samples. Ion chemical markers of each group separated by principal component analysis. ■, Control group (CT); ◆, Leprosy lesion group (L).

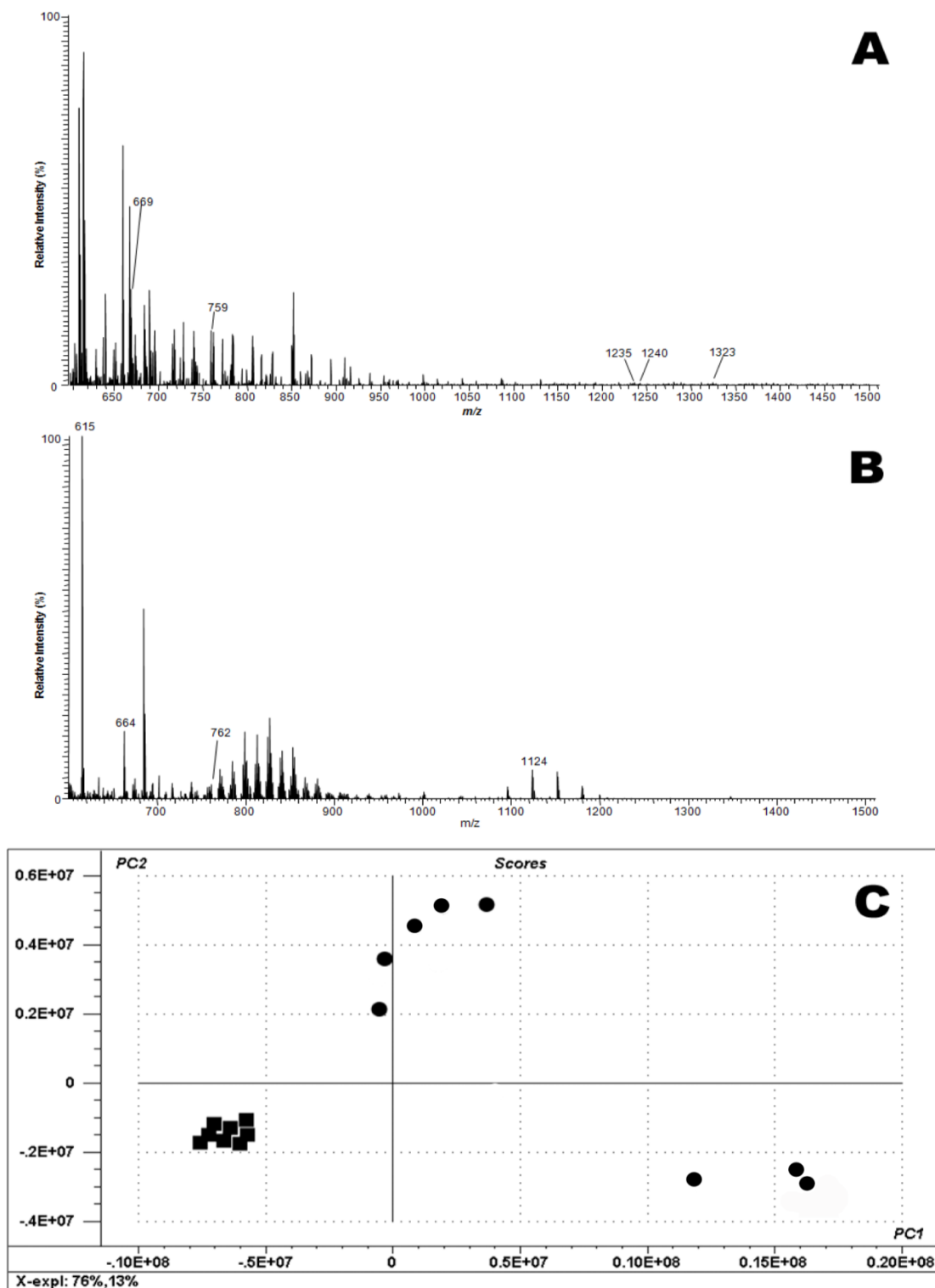


Figure 3. Representative fingerprinting of Control (A) and Leprosy unaffected skin (B) groups. The imaging represents a sum of all ions within mass range m/z 600-1500 on positive ion mode. (C) Principal component analysis of skin samples. Ion chemical markers of each group separated by principal component analysis.

■, Control group (CT); ●, Unaffected leprosy skin group (S).

Table 1. Lipid chemical markers identified via HR-FTMS of skin imprints (positive ion mode). Identification is based on the comparison between the exact and theoretical masses of each compound and Lipid Maps and Human Metabolome databases.

Sample	Molecule	Experimental mass (<i>m/z</i>)	Theoretical mass (<i>m/z</i>)	Error (ppm)	ID ^{a,b}
ControlSkin	[PA(O-16:0/17:1)+Na] ⁺	669.4839	669.4830	-1.34	LMGP10020009
	[PA(18:0/22:1(11Z))+H] ⁺	759.0909	759.5898	-1.45	LMGP10010318
	[Ganglioside GM3 (d18:1/22:1(13Z))+H] ⁺	1235.7965	1235.7987	1.77	HMDB11930
	[M(IP)2C(t18:0/16:0(2OH)) +Na] ⁺	1240.5958	1240.5979	1.69	LMSP03030102
	[Ganglioside GM2 (d18:0/12:0)+Na] ⁺	1323.7412	1323.7395	-1.28	HMDB11894
Leprosy lesion & Unaffected leprosy skin	[Phthioceranic acid (C40)+Na] ⁺	615.6048	615.6050	0.32	LMFA01020302
	[GlcCer(d14:2(4E,6E)/16:0)+Na] ⁺	664.4755	664.4759	0.60	LMSP0501AA52
	[PS(18:4/15:1)+Na] ⁺	762.4340	762.4345	0.66	LMGP03010430
	[α-Semegnamycolic acid + H] ⁺	1124.1640	1124.1658	1.60	LMFA01160003
	[(13E-Tetranor-16-oxo-16- CoA-LTE4)+Na] ^{+,c}	1181.2124	1181.2123	0.76	HMDB12576

Abbreviations: L, leprosy lesion skin group; S, leprosy unaffected skin group; GlcCer, glucosylceramides; M(IP), Myo-inositol-phosphate; PA, phosphatidic acid; PS, phosphatidylserine; LTE, leukotriene; ppm, part per million.

a LM: lipid maps ID.

b HMDB: human metabolome database ID.

c Exclusive for Leprosy lesion skin group (L).

DISCUSSION AND CONCLUSION

Traditional diagnostic methods for leprosy are based in clinical evaluation and invasive sample obtainment, but alone, none of these tests is considered enough to diagnose the disease, mainly in suspect cases¹³. Lipidomics and HMRS were the tools of choice to determine chemical markers on the skin that distinguish healthy individuals from leprosy patients, aiming to make them useful for leprosy diagnosis.

In order to study skin lipidomic profile and identify leprosy chemical markers, we have developed a new, comfortable and non-invasive procedure for sample obtainment based on a thin-layer chromatography (TLC) plate. TLC comprises a silica-gel matrix, forming an adsorbent layer upon an aluminum surface, and widely used as an analytical tool for chromatography studies because of its simplicity, relative low cost and inertness. Therefore, the goal of our study was using the TLC plate as a “patch” for skin lipid adsorption, without the interference of any other components.

Once the samples were collected and analyzed by mass spectrometry, the comparative analysis by the two PCA (Table 1) elected some chemical markers present in regular epidermis, with an accuracy of over 85%. Previous studies have shown that skin constitutes a large complex barrier between the body and the environment²¹. The outermost skin layer, epidermis, has been extensively studied by many researchers and its lipid composition is divided into phospholipids, neutral lipids, ceramides, cholesterol, gangliosides and other glycosphingolipids²²⁻²⁵. Among these molecules, phospholipids like *myo*-inositol-phosphate and phosphatidic acids were pointed as control group markers in our comparative analysis by PCA (Table 1). These results are in accordance to Natarajan et al.²³ that reviewed healthy skin architecture and its lipids. The phospholipids identified in our research can be part of the keratinocyte differentiation process that will constitute the epidermal stratum corneum (SC) layer. For that, during this process, keratinocytes become full of membrane-coating granules, referred to as lamellar bodies (LB), which are lipid storages rich in glucosylceramides, sphingomyelin and phospholipids. These lipids will be secreted in the extracellular space, followed by modification and cross-linking to produce SC's lipid matrix, the skin protective mantle²⁶. Thus, the skin's barrier function is dependent on LB components, which can include the phospholipids found in our results. PCA analysis also elected as control group chemical markers, the gangliosides GM2 and GM3 (Table 1). Gangliosides are sialylated membrane glycosphingolipids ubiquitously found in tissues and body fluids²⁷, localized specifically in the outer leaflets of plasma membranes. These glycosphingolipids comprise 0.1% of the total epidermal lipids²² and are involved in cell-cell recognition, adhesion and signal transduction within specific cell surface microdomains, namely caveolae²⁸, lipid rafts²⁹, or glycosphingolipid-enriched microdomains³⁰. GM2 and GM3 are gangliosides present in keratinocytes and skin melanocytes, but previous studies have shown that there is a higher GM3 content compared to GM2^{24,31}. Several investigations have proposed that ganglioside GM3 is a regulator of EGFR function. In this way, membrane expression of GM3 is able to impact not only cell proliferation, but also other ligand-independent EGFR functions that require crosstalk, such as cell migration and invasiveness³². On the other hand, GM2 function is not entirely clear in normal skin cells, thus investigations to understand the molecular mechanisms that lead to membrane-based events of ganglioside modulation will be critical for comprehending their function.

As shown in several studies, infectious diseases may change the skin lipid profile, modifying the barrier function and skin homeostasis maintenance^{23,33}. The statistical analysis based on PCA elected specific mycobacterial molecules such as, the

phthioceranic acid and α -smegma mycolic acid, present in both L and S groups, also with an accuracy of over 85%.

Phthioceranic acid or phthiocerol is part of the specific *M. leprae* antigen phenolic glycolipid (PGL-I), first reported in 1980³⁴. During the PGL-1 structure research, Hunter and Brennan defined the phthioceroldimycocerosate of *M. leprae* as consisting of a mixture of phthiocerols homologues, and this discovery resulted in understanding the establishment of the disease within a copious environment of exotic lipids of its own making³⁵. The other mycobacterial molecule identified, α -smegma mycolic acid is the major mycolic acid in most mycobacterial species and was first isolated and described in *Mycobacterium smegmatis* in 1966³⁶. However, as shown in our findings, this is the first report of α -smegma mycolic acid in *M. leprae*. Further studies are needed to understand the role of this molecule in leprosy infection, since mycolic acids are important characteristic constituents of the mycobacterial cell wall. Changes in the structure or composition of mycolic acids have been associated with modification of cell wall permeability and attenuation of pathogenic mycobacterial strains³⁷, which turns this molecule into a potential new target to *M. leprae* discovery field. The finding of mycobacterial lipids outside leprosy lesions can be explained by the presence of *M. leprae* on normal appearing skin of leprosy patients³⁸. AFB, cellular infiltrate (histiocytes and lymphocytes), and degenerative changes were observed in erector pili muscle in all manifestations of leprosy, being more significative in multibacillary patients^{38,39}. Hence, the presence of AFB on normal appearing skin would have implications on leprosy persistence and dissemination³⁹.

In addition to mycobacterial molecules, lipids related to inflammation and apoptosis were elected by PCA for S and L groups' analysis, such as phosphatidylserine and glucosylceramide. Leukotriene E4, another chemical marker elected by PCA, was the only one elected for the L group. Leukotrienes (LTs) are inflammatory lipids mediators derived from the 5-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism and, of the three cysteinyl leukotrienes (cys-LTs) (LTC₄, LTD₄, LTE₄), LTE₄ is the most stable and might be active for a prolonged time after its synthesis⁴⁰. Leukotriene E4 is generated *in vivo* by mast cells, eosinophils, basophils and macrophages⁴¹, and it is capable of inducing persistent eosinophilia and is potent enough to generate vasoactive cutaneous responses, mainly Th2 inflammatory responses like bronchial asthma^{40,42}. Leprosy patients evaluated in our study were clinically diagnosed with multibacillary leprosy forms (LL and BL), indicating that the predominant immune response is based on Th2 cytokines synthesis⁴³. Thus, the identification of LTE₄ as a *M. leprae* lesion chemical marker is coherent with the inflammatory response developed at the injured site, and can be considered a significant lipid marker for leprosy lesions. Probably, the PCA result for leprosy skin samples (S) did not show LTE₄ as a chemical marker because this sample was collected from not affected by leprosy skin, where there is no visible inflammatory response, like edema, erythema and inflammatory cell infiltration⁴⁴. It is possible that LTE₄ concentration on uninjured skin sites was lower than lesion skin sites, what corroborates with PCA chemical markers' election. Previous studies on metabolomics of skin from leprosy patients showed an increased eicosanoid metabolism before multidrug treatment (MDT), which proceeded to normal levels after MDT¹⁸, supporting the observation of LTE₄ on leprosy lesions.

Another identified lipid chemical marker was phosphatidylserine, one of the major phospholipids presents in cell membrane. Normally, it is confined to the inner leaflet of the membrane bilayer but, during apoptosis, it is externalized to the outer surface of the cell membrane. Increasing numbers of bacterial pathogens have been identified as mediators of apoptosis *in vitro*⁴⁵, including mycobacteria⁴⁶. According to Santucci et al.⁴⁷, under mycobacterial infection, apoptotic cells present outer membrane-exposed phosphatidylserine. This phospholipid can be recognized by a phosphatidylserine

phagocyte receptor, what will initiate the uptake of apoptotic cell signals. Supporting this data, phosphatidylserine was observed by MALDI Imaging MS of skin biopsies from leprosy patients, before and after MDT, presenting weak or almost absent signals on control skins¹⁹. Taken together, it can be speculated that phosphatidylserine has an important function on leprosy pathophysiology, which remains to be studied.

The last leprosy chemical marker elected by PCA was a glucosylceramide (GlcCer), a well-established class and core structure for over 300 glycolipids⁴⁸. GlcCer biosynthesis is modulated by multiple endogenous and exogenous compounds, and can be synthesized by different pathways: from palmitoylCoA and serine via sphinganine to ceramide, from hydrolysis of glycolipids, or from hydrolysis of sphingomyelin to ceramide. Glucosylceramide can be used as precursor of more highly-glycosylated glycosphingolipids such as lactosylceramide (galactosylglucosylceramide), which have both mitogenic⁴⁹ and apoptotic roles⁵⁰. These cerebrosides are also converted into gangliosides and can be metabolized back to ceramide by hydrolysis⁵¹. All these characteristics elucidates many questions about why has GlcCer been selected as a marker for leprosy patients. This glucosylceramide is potentially derived from a ceramide synthesized via sphingomyelin hydrolysis, typical in leprosy-affected peripheral nerves⁵². Another hypothesis is that GlcCer can be involved in the lipid accumulation inside infected foamy macrophages⁵³, just like the lipid storage disorder at Gaucher's disease⁵⁴. There are many hypotheses to explain this selected chemical marker, but the exact role of glucosylceramide in leprosy infection needs to be elucidated.

Based on the results presented above, our method was capable of differentiate healthy and leprosy skin and identify a specific *M. leprae* chemical marker at lepromatous leprosy patients. Furthermore, the sample obtainment was not harmful for the patients, contrasting with current laboratory methods for leprosy diagnosis. One of the most interesting results in this research was the fact that leprosy lesion markers were similar to the leprosy uninjured skin markers (Figures 2 and 3). This allows us to infer that this new diagnosis methodology can potentially be used for identifying suspected cases of leprosy (subclinical infection), where there is no characteristic skin lesion or well-defined clinical signals. Since leprosy is considered a systemic disease and present skin tropism⁵⁵, even subclinical infections may be detected through the skin imprinting method on silica plate. Thus, we believe that this new diagnostic tool exhibits great potential to become a method to detect specific mycobacterial markers, such as phthiocerol and/or mycolic acid, even in uninjured skin of leprosy suspect patients, independently of lesion presence.

The development of a non-invasive and most sensitive diagnose method is extremely important for the patient and the clinician, who can early and accurately prescribe the treatment, a key element to break the chain of leprosy transmission and the individual stigmatization in society. Therefore, we believe that a further step should be taken, which is the validation of this new method, establishing specific leprosy markers considering other skin diseases. Nonetheless, the results found in this contribution are an evidence that there is hope to make a better and faster leprosy diagnosis.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* E-mail: rrcatharino@gmail.com. Phone: +55 19 35219138.

Author Contributions

‡These authors contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

INNOVARE Biomarkers Laboratory would like to thank CNPq and São Paulo Research Foundation (FAPESP, process numbers: 11/50400-0, 14/00084-2, 14/00302-0 and 14/23010-4). CSM and MCVP would like to thank National Institute of Science and Technology for Innovation on Neglected Diseases (INCT-IDN).

REFERENCES

- (1) Merle, C. S.; Cunha, S. S.; Rodrigues, L. C. 2010.
- (2) Pannikar, V. *Lepr Rev* 2009, **80**, 353-354.
- (3) *Wkly Epidemiol Rec* 2013, **88**, 365-79.
- (4) Heijnders, M. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2004, **72**, 437-47.
- (5) Weiss, M. G.; Ramakrishna, J.; Somma, D. *Psychology, Health & Medicine* 2006, **11**, 277-287.
- (6) Predaswat, P. B. *Khi Thut, "The Disease of Social Loathing": An Anthropology of the Stigma of Leprosy in Rural Northeast Thailand*. University of California, San Francisco 1992.
- (7) Ridley, D. S.; Jopling, W. H. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966, **34**, 255-73.
- (8) Scollard, D.; Adams, L.; Gillis, T.; Krahenbuhl, J.; Truman, R.; Williams, D. *Clinical Microbiology Reviews* 2006, **19**, 338-381.
- (9) Jacobson, R. R.; Krahenbuhl, J. L. *Lancet* 1999, **353**, 655-60.
- (10) Organization, W. H. 1998.
- (11) WHO. Available at: <http://www.who.int/lep/diagnosis/en/>, 2014.
- (12) Smith, W. *Leprosy review* 1997, **68**, 195-200; Noordeen, S. *Leprosy review* 1992, **63**, 1; Deepak, S. *Indian journal of leprosy* 2003, **75**, 127-146.
- (13) Lastória, J. C.; Abreu, M. A. M. d. *Anais brasileiros de dermatologia* 2014, **89**, 389-401.
- (14) Brasil, M. d. S., Saúde, S. d. V. e., Ed.; Ministério da Saúde: DOU, 2010, p 54; Shepard, C. C.; McRae, D. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association* 1967, **36**, 78-82.
- (15) Organization, W. H. 1982.
- (16) Carrasco-Pancorbo, A.; Navas-Iglesias, N.; Cuadros-Rodriguez, L. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2009, **28**, 263-278.
- (17) Al-Mubarak, R.; Vander Heiden, J.; Broeckling, C. D.; Balagon, M.; Brennan, P. J.; Vissa, V. D. *PLoS neglected tropical diseases* 2011, **5**, e1303.
- (18) Amaral, J. J.; Antunes, L. C. M.; de Macedo, C. S.; Mattos, K. A.; Han, J.; Pan, J.; Candéa, A. L.; Maria das Graças, M.; Ribeiro-Alves, M.; Borchers, C. H. *PLoS neglected tropical diseases* 2013, **7**, e2381.
- (19) de Macedo, C. A., DM; Pascarelli, BM; Spraggins, JM; Sarno, EN; Schey, KL; Pessolani, MCV. *Unpublished work*.
- (20) Erve, J. C.; DeMaio, W.; Talaat, R. E. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2008, **22**, 3015-3026.
- (21) Elias, P. M.; Friend, D. S. *The Journal of cell biology* 1975, **65**, 180-191.
- (22) Pappas, A. *Dermatoendocrinol* 2009, **1**, 72-76.
- (23) Natarajan, V. T.; Ganju, P.; Ramkumar, A.; Grover, R.; Gokhale, R. S. *Nature chemical biology* 2014, **10**, 542-551.
- (24) Paller, A. S.; Arnsmeier, S. L.; Robinson, J. K.; Bremer, E. G. *Journal of investigative dermatology* 1992, **98**, 226-232.

- (25) Boddé, H. E.; Holman, B.; Spies, F.; Weerheim, A.; Kempenaar, J.; Mommaas, M.; Ponc, M. *Journal of investigative dermatology* 1990, 95, 108-116; Yardley, H. J.; Summerly, R. *Pharmacology & therapeutics* 1981, 13, 357-383.
- (26) Van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G.; Bouwstra, J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2014, 1841, 295-313; Feingold, K. R.; Elias, P. M. *Biochim Biophys Acta* 2014, 3, 280-94.
- (27) Robert, K. Y.; Nakatani, Y.; Yanagisawa, M. *Journal of lipid research* 2009, 50, S440-S445.
- (28) Anderson, R. G. *Annual review of biochemistry* 1998, 67, 199-225.
- (29) Simons, K.; Toomre, D. *Nature reviews Molecular cell biology* 2000, 1, 31-39.
- (30) Hakomori, S.-i.; Handa, K.; Iwabuchi, K.; Yamamura, S.; Prinetti, A. *Glycobiology* 1998, 8, xi-xviii.
- (31) Herlyn, M.; Thurin, J.; Balaban, G.; Bennicelli, J. L.; Herlyn, D.; Elder, D. E.; Bondi, E.; Guerry, D.; Nowell, P.; Clark, W. H.; et al. *Cancer Res* 1985, 45, 5670-6.
- (32) Bremer, E.; Schlessinger, J.; Hakomori, S.-I. *Journal of Biological Chemistry* 1986, 261, 2434-2440; Wang, X.-q.; Paller, A. S. *Open Dermatology Journal* 2009, 3, 159-162.
- (33) Pillai, S.; Oresajo, C.; Hayward, J. *International journal of cosmetic science* 2005, 27, 17-34.
- (34) Brennan, P. J.; Barrow, W. W. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association* 1980, 48, 382-387.
- (35) Spencer, J. S.; Brennan, P. J. *Leprosy review* 2011, 82, 344.
- (36) Krembel, J.; Etemadi, A.-H. *Tetrahedron* 1966, 22, 1113-1119; Asselineau, J.; Lanéelle, G. *Frontiers in Bioscience* 1998, 3, e164-174.
- (37) Choi, K. H.; Kremer, L.; Besra, G. S.; Rock, C. O. *J Biol Chem* 2000, 275, 28201-7.
- (38) Job, C. K.; Jayakumar, J.; Aschhoff, M. "Large numbers" of *Mycobacterium leprae* are discharged from the intact skin of lepromatous patients; a preliminary report; *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999 Jun; 67(2):164-7.
- (39) Budhiraja, V.; Rastogi, R.; Khare, S.; Khare, A.; Krishna, A. *International Journal of Infectious Diseases* 2010, 14, e70-e72.
- (40) Lee, T. H.; Woszczek, G.; Farooque, S. P. *Journal of allergy and clinical immunology* 2009, 124, 417-421.
- (41) FORD-HUTCHINSON, A.; RACKMAN, A. *British Journal of Dermatology* 1983, 109, 26-29; Paruchuri, S.; Tashimo, H.; Feng, C.; Maekawa, A.; Xing, W.; Jiang, Y.; Kanaoka, Y.; Conley, P.; Boyce, J. A. *The Journal of experimental medicine* 2009, 206, 2543-2555; Kanaoka, Y.; Boyce, J. A. *The Journal of Immunology* 2004, 173, 1503-1510.
- (42) Laitinen, A.; Lindqvist, A.; Halme, M.; Altraja, A.; Laitinen, L. A. *Journal of allergy and clinical immunology* 2005, 115, 259-265.
- (43) Modlin, R.; Bloom, B. *Hospital practice (Office ed.)* 1993, 28, 71-4, 77-80, 83-4; Mendonça, V. A.; Costa, R. D.; Melo, G. E. B. A. d.; Antunes, C. M.; Teixeira, A. L. *Anais brasileiros de dermatologia* 2008, 83, 343-350.
- (44) Soter, N. A.; Lewis, R. A.; Corey, E.; Austen, K. F. *Journal of investigative dermatology* 1983, 80, 115-119.
- (45) Gallucci, S.; Matzinger, P. *Current opinion in immunology* 2001, 13, 114-119.
- (46) Matzinger, P. In *Seminars in immunology*; Academic Press, 1998, pp 399-415.
- (47) Santucci, M.; Amicosante, M.; Cicconi, R.; Montesano, C.; Casarini, M.; Giosue, S.; Bisetti, A.; Colizzi, V.; Fraziano, M. *Journal of Infectious Diseases* 2000, 181, 1506-1509.
- (48) Basu, S.; Kaufman, B.; Roseman, S. *Journal of Biological Chemistry* 1968, 243, 5802-5804.
- (49) Ogura, K.; Sweeley, C. C. *Experimental cell research* 1992, 199, 169-173.
- (50) Marks, D. L.; Wu, K.; Paul, P.; Kamisaka, Y.; Watanabe, R.; Pagano, R. E. *J Biol Chem* 1999, 274, 451-6.

- (51) Radin, N. S. *European Journal of Biochemistry* 2001, 268, 193-204.
- (52) Scollard, D. M. *Lepr Rev* 2008, 79, 242-53.
- (53) Rubin, R.; Strayer, D. S.; Rubin, E. *Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine*; Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- (54) Nilsson, O.; Svennerholm, L. *Journal of neurochemistry* 1982, 39, 709-718; Miller, S. P.; Zirzow, G. C.; Doppelt, S. H.; Brady, R. O.; Barton, N. W. *J Lab Clin Med* 1996, 127, 353-8.
- (55) Ridley, D. S. *Pathogenesis of leprosy and related diseases*; Butterworth Scientific Ltd, 1988.

SUPPORTING INFORMATION

Table S-1. Clinical and laboratorial data from leprosy patients and control subjects

PATIENT	SAMPLING DATE	AGE	SEX	DORSAL REGION	ILB	BI	SKIN MANIFESTATION	DIAGNOSIS
1	06/26/2014	50	M	Bottom	4.6	4.75	Mid tubercle	LL
2	06/30/2014	34	M	Middle/ top	4.85	5.75	Small tubercle	LL
3	07/01/2014	37	M	Bottom	5.7	5.0	Skin peeling	LL
4	08/12/2014	45	M	Middle/ top	4.9	5.0	Small tubercle	LL
5	08/28/2014	51	M	Bottom/middle	5.5	0.75	Small tubercle	LL
6	09/01/2014	39	M	Bottom/middle	5.6	4.75	Mid tubercle	LL
7	09/02/2014	72	M	Bottom/middle	3.85	0.0	Mid tubercle	BL
8	09/08/2014	61	M	Top	5.95	4.75	Large tubercle	LL/ENL
CT_1	10/03/2014	26	M	Bottom				
CT_2	10/03/2014	38	M	Top				
CT_3	10/03/2014	24	M	Bottom				
CT_4	10/03/2014	20	M	Bottom				
CT_5	10/03/2014	30	M	Top				
CT_6	10/07/2014	43	M	Bottom				
CT_7	10/07/2014	30	M	Top				
CT_8	10/07/2014	29	M	Top				

Abbreviations: ID, identification; ILB, logarithmic index of biopsy; BI, bacillary index; M, male; LL, lepromatous leprosy; BL, borderline leprosy; ENL, erythema nodosum leprosum; CT, control subject.

Conclusões gerais

A metodologia proposta neste trabalho apresenta-se promissora para o diagnóstico da Hanseníase. Primeiramente, o método de coleta da amostra por meio da placa de sílica se mostrou rápido, simples, não invasivo e eficaz para a adsorção de lipídeos da pele, etapa essencial para a análise com a ferramenta proposta. Em seguida, o processamento e análise da amostra por meio de ESI-HRMS se mostraram técnicas de alta acurácia para a identificação de marcadores lipídicos diferenciais entre amostras dos indivíduos saudáveis e doentes, independente da presença de lesão cutânea. Portanto, os resultados obtidos na análise das amostras apontam para um potencial método diagnóstico para a hanseníase, não invasivo, mais rápido e mais direto que o convencional. No entanto, mais experimentos são necessários para comprovar essa hipótese, como validação e comparação com outros tipos de hanseníase, como a forma Paucibacilar e as formas indeterminadas (casos suspeitos), além de outros tipos de doenças de pele.